

氏	牧	優	士
授与した学位	博	歯	学
専攻分野の名称	博	甲	第 3 1 0 4 号
学位授与の番号	平	成	1 8 年 3 月 2 4 日
学位授与の日付	医歯学総合研究科病態制御科学専攻(学位規則第4条第1項該当)		
学位授与の要件	Role of O ⁶ -methylguanine-DNA methyltransferase and effect of O ⁶ -benzylguanine on the anti-tumor activity of cis-diaminedichloroplatinum(II) in oral cancer cell lines.		
学位論文題名	(口腔癌細胞株におけるcis-diaminedichloroplatinum(II)の抗癌作用にO ⁶ -methylguanine-DNA Methyltransferaseが及ぼす影響とO ⁶ -methylguanine-DNA methyltransferase阻害剤O ⁶ -benzylguanineとcis-diaminedichloroplatinum(II)の併用効果についての研究)		
論文審査委員	教授 佐々木 朗	教授 滝川 正春	教授 岸 幹二

学位論文内容の要旨

緒言

口腔癌治療において抗癌剤は有効な治療法のひとつである。しかしながら、抗癌剤に対する感受性には個人差があり、その感受性を投与前に予測できれば、癌治療において有効な薬剤選択が行える。白金製剤はリンパ腫、卵巣癌、肺癌、頭頸部癌など多くの治療に用いられる抗癌剤であり、単独もしくは様々な抗癌剤と共に用いられている。なかでも、cis-Diaminedichloroplatinum (II) (シスプラチン;以下 CDDP と略す)は、DNA のクロスリンクを形成し、癌細胞において転写、複製過程を阻害し、細胞死をひき起こすことでその抗癌作用を発揮する。こうしたクロスリンクは nucleotide excision repair proteins (NERs)による除去修復を受ける事が知られており、癌における NER 発現と CDDP 感受性の相関についての報告もある。さらに CDDP への感受性を増強させる目的で、CDDP 感受性原因因子、感受性予測因子についての報告もある。

近年、CDDP が O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (以下 MGMT と略す)活性を低下させる事が報告され、また、MGMT のプロモーター領域に生じるメチル化が CDDP 感受性に関連するとの報告がある。MGMT は、DNA のグアニンの O⁶ 位等に付与されたアルキル基を取り除く DNA 修復酵素であり、修復にあたり失活する自殺酵素である。その活性レベルは、DNA のグアニンの O⁶ 位等にアルキル基を付与することにより抗癌作用を発揮するアルキル化剤に対する感受性に影響する。例えば、ヒト由来癌細胞株の中には MGMT 低発現株が存在するが、その細胞は、アルキル化剤に対して高い感受性を有することが知られている。近年では、MGMT 阻害剤 O⁶-benzylguanine (以下 O⁶-BG と略す)を利用する事でアルキル化剤に対する感受性を増強する試みも行われており、臨床試験段階にある。このような阻害剤に加え、CDDP も MGMT 活性を阻害する事、また、アルキル化剤よりも広く利用されていることから、MGMT 発現が CDDP 感受性に関連し、増強作用を持つ事を明らかに出来れば抗癌剤治療に新たな治療法を提案出来る。

本研究では、ヒト口腔癌および大腸癌細胞株における MGMT 発現レベルと CDDP 感受性との関連性、さらに MGMT 阻害剤 O⁶-BG による CDDP 感受性への影響を検討した。

材料と方法

1. 使用細胞株

使用細胞株はヒト口腔癌細胞株4株(MGMT 低発現株; SAS, Hep2, MGMT 高発現株; HSC4, HSC3)を用いた。培養は、10%ウシ胎児血清を含む Dulbecco's modified Eagle medium を用いて、95%空気+5%炭酸ガス条件下、CO₂ インキュベーターにて 37°Cで行った。

2. CDDP 投与前後での MGMT 発現レベル

各細胞株から mRNA と総タンパクを抽出し、RT-PCR 法およびマウス抗 MGMT モノクローナル抗体 MT 3.1 Ab-1 (Neomarkers, Fremont, CA)を用いたウェスタンブロッティング法によって、CDDP 投与前後での MGMT 発現レベルを比較した。

3. CDDP 感受性

CDDP に対する感受性を MTT assay によって調べた。

4. O⁶-BG 併用による CDDP 感受性

MGMT 阻害剤 O⁶-BG 投与し、CDDP に対する感受性の変化を MTT assay によって調べた。

結果

1. CDDP 投与前後での MGMT 発現レベル

CDDP 投与によって MGMT 発現は低下した。RT-PCR および、ウェスタンブロッティングの MGMT 発現の結果は一致して低下しており、転写レベルに影響を与える事が明らかになった。

2. CDDP 感受性

MGMT 低発現細胞株2株は、MGMT 高発現細胞株2株に比べて CDDP に対して顕著に高い感受性を示した。

3. O⁶-BG 併用による CDDP 感受性

MGMT 阻害剤 O⁶-BG 投与した場合、CDDP に対する感受性が増強された。

考察とまとめ

本研究により、口腔癌細胞株での MGMT 発現は、CDDP により転写レベルにて低下し、CDDP 感受性にも影響することが示唆できた。本研究で示した MGMT 発現の多寡は、CDDP 感受性のスクリーニングテストとして応用でき、さらに O⁶-BG 併用 CDDP 投与法は、検査結果に基づいた新たな薬剤選択の可能性を示唆できた。

論文審査の結果の要旨

口腔癌治療において抗癌剤は有効な治療法のひとつである。しかしながら、抗癌剤に対する感受性には個人差があり、その感受性を投与前に予測できれば、癌治療において有効な薬剤選択が行える。白金製剤は临床上広く用いられる抗癌剤であり、単独もしくは様々な抗癌剤と共に用いられている。なかでも、**cis-Diaminedichloroplatinum(II)**(以下シスプラチンと略す)は、DNAのクロスリンクを形成し、癌細胞において転写、複製過程を阻害し、細胞死をひき起こすことでその抗癌作用を発揮する。近年、シスプラチンが O^6 -メチルグアニン-DNAメチルトランスフェラーゼ(以下MGMTと略す)活性を低下させる事が報告され、また、MGMTがシスプラチン感受性に関連するとの報告がある。本研究は、口腔癌細胞株を用いて、MGMT発現の多寡が、シスプラチン感受性に影響を及ぼすかどうかについて検討したものである。

ヒト口腔癌細胞株4株を用いた本研究においては、MGMT高発現株群2株と、MGMT低発現株群2株に分かれた。これらの細胞株にシスプラチン投与を行ったところ全ての細胞株においてMGMT発現の低下を認めた。さらにシスプラチン感受性はMGMT高発現株で低く、低発現株で高かったこと、また、MGMT阻害剤 O^6 -ベンジルグアニン併用により、シスプラチン抗腫瘍効果の増強を認めた。これらの結果は、MGMT発現がシスプラチン抗腫瘍効果に影響を及ぼす可能性を示したものであり、極めて意義がある。さらにシスプラチン感受性の指標としてのMGMT発現の可能性、また、シスプラチンと O^6 -ベンジルグアニン併用投与法の臨床応用への可能性を示唆しており、期待できる。従って、本論文は博士(歯学)の学位に値するものと判定した。